

NOTA CIENTÍFICA

Bioensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado**Acute toxicity assays using *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) maintained in a modified culture medium**

Monica Núñez* y Jasmin Hurtado

Presentado: 28/10/2004

Aceptado: 24/06/2005

Resumen

Daphnia magna es utilizada como bioindicador ambiental de efluentes dulciacuícolas en ensayos ecotoxicológicos, sin embargo los sistemas de cultivo tradicionales pueden resultar costosos, por lo cual se ha desarrollado un nuevo medio de cultivo. Se aislaron 10 cepas de *D. magna*, se evaluó el desarrollo de la población (Conteo total de individuos y de hembras grávidas) empleando 3 medios de cultivo, medio A: jugo de alfalfa (0,250 gr/mL), medio B: levadura fresca disuelta y medio C: jugo de alfalfa y levadura disuelta. De las 10 cepas, 4 desarrollaron satisfactoriamente en el medio A, pero no sobrevivieron en los otros medios. En los ensayos ecotoxicológicos agudos frente a dicromato de potasio se encontraron valores promedio de EC50-24h 0,4045 mg/L \pm 0,0389 y EC50-48h 0,1857 mg/L \pm 0,0072. Con estas 4 cepas se realizaron ensayos ecotoxicológicos agudos para cianuro de potasio, que es un contaminante del sector minero, encontrándose valores de EC50-24h 1,5388 mg/L \pm 0,1146 y EC50-48h de 0,6359 mg/L \pm 0,0516. Los valores de EC50 a las 48 horas están por debajo del límite permisible para liberación de cianuro en efluentes del sector Energía y Minas.

Palabras Clave: *Daphnia magna*, ensayo ecotoxicológico, cromo, cianuro

Abstract

Daphnia magna is a test organism used in ecotoxicological assays of freshwater; however, traditional culture systems for this organism could result expensive, for that the aim of this research was to develop a new economic culture medium. With this purpose, 10 strains of *D. magna* were isolated, their population development was evaluated by total count of organisms and pregnant females using 3 different culture media: (A) alfalfa juice, (B) solved yeast and (C) a mixture of alfalfa juice plus solved yeast. Successful development of 4 strains was observed in the A medium, but the same strains failed to survive in the B and the C media. The 24h and 48h EC50 average values in acute ecotoxicological assays with potassium dicromate were 0,4045 mg/L \pm 0,0389 and 0,1857 mg/L \pm 0,0072 respectively. Also, acute ecotoxicological assays with these 4 strains were performed using potassium cyanide, which is a toxic reactive frequently used in mining operations. In this case 24h EC50 value was 1,5388 mg/L \pm 0,1146 and 48h EC50 values were 0,6359 mg/L \pm 0,0516. 48h EC50 values were lower than the cyanide permissible effluent values established by the Energy and Mining Authority.

Keywords: *Daphnia magna*, ecotoxicological assays, chromium, cyanide

Gran parte de la economía de nuestro país depende de la industria minera, lamentablemente la extracción de minerales produce grandes cantidades de metales pesados y otros contaminantes que pueden ser liberados al ambiente cuando no se realiza un control adecuado por parte de la empresa minera, es por ello que el

Ministerio de Energía y Minas define los límites máximos permisibles (LMP) de contaminantes presentes en efluentes mineros (Tabla 1), por ejemplo el límite máximo permisible para cianuro total es de 1 mg/L. Por otro lado el Ministerio de Salud a través del Decreto Ley N° 17762 determina los límites máximos permisibles para diferentes contaminantes en las seis clases de agua, por ejemplo para cromo hexavalente en aguas para riego de vegetales es de 1 mg/L.

(*) Laboratorio de Biotecnología Ambiental.
Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú
Email Monica Núñez: monicanunez@peru.com

Tabla 1. Niveles Máximos Permisibles de Emisión para las Unidades Minero-Metalúrgicas, de acuerdo a Resolución Ministerial N° 011-96-EM/VMM

Parametro (mg/L)	Valor en Cualquier Momento	Valor promedio Anual
pH	> 6 y < 9	> 6 y < 9
Sólidos Suspendidos	50	25,0
Plomo	0,4	0,2
Cobre	10,0	0,3
Zinc	3,0	1,0
Fierro	2,0	1,0
Arsénico	1,0	0,5
Cianuro total *	1,0	1,0

* Cianuro Total, equivalente a 0,1 mg/L de Cianuro Libre y 0,2 mg/L de Cianuro fácilmente disociable en ácido.

Instituciones en todo el mundo, como la EPA de Estados Unidos están desarrollando estrategias de biomonitorio ambiental para determinar el grado de contaminación en el medio ambiente (Biesenger et al., 1997; Horning & Weber, 1985). Los costos de análisis físicoquímicos convencionales pueden resultar muy elevados y no representan de manera real el impacto de los contaminantes sobre el ambiente por lo que el uso de bioindicadores sería una estrategia simple y efectiva para sospechar de la presencia de contaminación que estaría afectando al ecosistema en estudio.

Daphnia magna es el crustáceo cladóceros más comúnmente utilizado en ensayos ecotoxicológicos, por ser de fácil establecimiento en el laboratorio y corto ciclo vital. Asimismo *D. magna* representa de manera ideal al zooplankton en estudios ecotoxicológicos (Dodson & Hanazato, 1995). El cultivo de *Daphnia magna* se realiza normalmente empleando los métodos recomendados en la norma ISO 6341 (1982) y las diferentes metodologías de cultivo descritas en otros artículos (Ferrando et al., 1999; Withman & Miller, 1982), que pueden resultar muy costosas.

El cianuro es utilizado en la recuperación de metales preciosos, como producto se for-

ma una solución cargada (Solución de Barren) que contiene cianuro acomplejado con metales como oro, plata, fierro (III), cobre (II), níquel y zinc. El único bioensayo reportado para cianuro utilizando cladóceros es el realizado por Lee et al. (1997) quienes describen a una prueba de toxicidad basada en la ingesta de algas por *Ceriodaphnia dubia*.

En el presente trabajo se trata de evaluar el uso de *D. magna* como bioindicador en ensayos ecotoxicológicos frente a cianuro, el cual es ampliamente utilizado en el Perú, asimismo desarrollar un medio de cultivo que sea económicamente accesible y reproducible.

Obtención e identificación del Bioindicador

Se tomaron muestras de agua de un estanque en el distrito de La Molina, Lima. Se revisó la muestra y se aislaron a todos los cladóceros presentes colocándolos en envases individuales con agua del propio estanque. Los cladóceros fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la UPCH donde se mantuvieron con fotoperíodo 16 horas luz – 8 horas oscuridad, la temperatura del agua se mantuvo a 20 ± 2 °C.

Para la aclimatación de los individuos el agua de estanque fue reemplazada paulatinamente con agua potable declorada (reposada por 7 días para eliminar el cloro residual).

Se enviaron muestras al Laboratorio de Ecología y Sistemática Acuática del Colegio de la Frontera Sur – México en viales con alcohol al 70°, donde fueron identificados por el Dr. Manuel Elías Gutiérrez.

Evaluación de Medios de Cultivo

La evaluación del sistema de cultivo se realizó mediante observaciones periódicas del desarrollo de la población (incremento general de la población y conteo de hembras grávidas).

Los cultivos se iniciaron terminada la fase de aclimatación colocando en tres recipientes de 3 litros con 2 litros de agua potable declorada a 10 individuos descendientes de cada uno de las 10 cepas aclimatadas, los me-

dios de cultivo fueron probados utilizando 4 cepas con el medio A, 3 cepas con el medio B y 3 con el medio C, en todos los casos por triplicado.

Los medios utilizados estaban formados por: Agua de clorada (2 L) y alimento (10 mL). Como fuentes de alimento se empleó: Medio A, 10 mL de jugo de alfalfa con una concentración de 0,25 g/mL; medio B, 10 mL de levadura fresca disuelta con una concentración de 0,1 g/mL; y medio C, 5 mL de jugo de alfalfa y 5 mL de levadura disuelta.

En todos los casos el alimento fue administrado cada 3 días y el cambio de agua de los recipientes se realizó parcialmente cada 10 días y totalmente cada 30 días.

Evaluación de sensibilidad de *Daphnia magna*

Para evaluar la sensibilidad de las cepas se calculó la concentración efectiva media (EC 50) frente a dicromato de potasio, realizándose de acuerdo con lo recomendado por la ISO 6341-1982. Se expusieron 10 neonatos de cada cepa a 50 mL de dicromato de potasio: 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,2 mg/L para los ensayos de toxicidad de 24 h y 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,2; 0,1 mg/L para los ensayos de toxicidad de 48 h.

Las pruebas se realizaron a pH $7 \pm 0,5$, temperatura entre 20 ± 2 °C, fotoperiodo 16:8 luz / oscuridad y no se alimentaron durante la prueba. Cada experimento se hizo por duplicado y se repitieron las series 3 veces.

Ensayo ecotoxicológico agudo de cianuro

Se expusieron 10 neonatos de cada cepa a 50 mL de cianuro de potasio: 25; 10; 5; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5 mg/L para los ensayos de toxicidad 24 h y 48 h. Las pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones que en los ensayos frente a dicromato de potasio.

Análisis Estadístico

La EC50 y sus límites de confianza al 95% se calcularon con el programa de análisis Probit versión 1.4. El modelo de regresión fue verificado usando Chi-cuadrado. Se realizaron

las pruebas de ANOVA y t-Student para determinar la presencia de diferencias significativas de control contra grupos de tratamiento.

Obtención e identificación de *Daphnia magna*

De los 26 individuos recolectados en el estanque, sólo 10 se desarrollaron normalmente (producción de >15 neonatos en 7 días), los cladóceros adultos que no se reprodujeron óptimamente fueron descartados.

Estos 10 individuos fueron identificados por el Dr. Gutierrez como *Daphnia magna* Straus (Familia Daphniidae) según la clave taxonómica de Brooks.

Evaluación de medios de cultivo

Se pudo observar que las cepas mantenidas con los medio B y C no duraban más de una semana (Figura 1), a las 48 horas la levadura causaba una fuerte turbidez en el medio de cultivo y después de 7 días todos los individuos eran encontrados muertos.

En cambio, las 4 cepas mantenidas en el medio A mostraron un incremento en la densidad poblacional, tanto del número total de individuos como del número de hembras grávidas (Figura 2).

Evaluación de sensibilidad frente a cromo y cianuro

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad a dicromato de potasio y cianuro de potasio en los ensayos de ecotoxicidad aguda sobre *D. magna* se muestran en la Figura 3. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los grupos tratamiento y control.

Discusión y conclusiones

Una de las razones por la cual *D. magna* es tan utilizada como bioindicador ambiental radica en su tipo de reproducción, que presenta dos fases, sexual y asexual. Si encuentra condiciones favorables mantiene la fase asexual conocida como partenogénesis, lo que nos permitiría trabajar con poblaciones genéticamente uniformes. De los 26 individuos recolectados sólo sobrevivieron y se desarrolla-

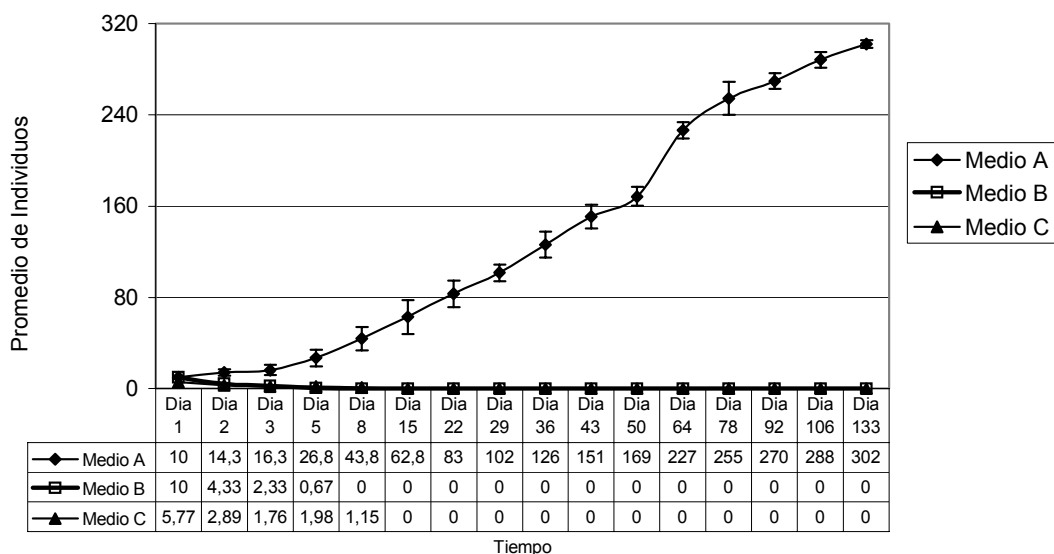


Figura 1. Desarrollo promedio de las cepas de *Daphnia magna* en los 3 medios evaluados (número de replicas n=3). Las barras verticales representan la desviación estándar.

ron aquellos que podían mantener una reproducción partenogénica bajo las condiciones dadas.

La metodología estándar descrita en la ISO 6341, así como otros artículos (Silva et al., 2001; Sobral et al., 2001), utilizan medios de cultivo de *D. magna* que emplean: Agua reconstituida y alimento.

El agua reconstituida se prepara con agua bidestilada deionizada y sales como nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato dihidrogenado de potasio, ácido cítrico monohidratado y citrato de amonio férrico

(ISO, 1982). En el trabajo desarrollado por Ferrando et al. (1999) y Sánchez et al. (1999) utilizan como alternativa el agua reposada o dechlorada para el mantenimiento de sus cultivos, es por ello que elegimos mantener nuestras cepas con agua dechlorada.

Como alimento se emplea algas unicelulares, entre las más utilizadas podemos mencionar a *Selenastrum capricornutum* (Sobral et al., 2001), *Nannochloris oculata* (Sánchez et al. 1999) o *Anikistrodesmus falcatus* (Martínez-Tabche et al., 1999). En

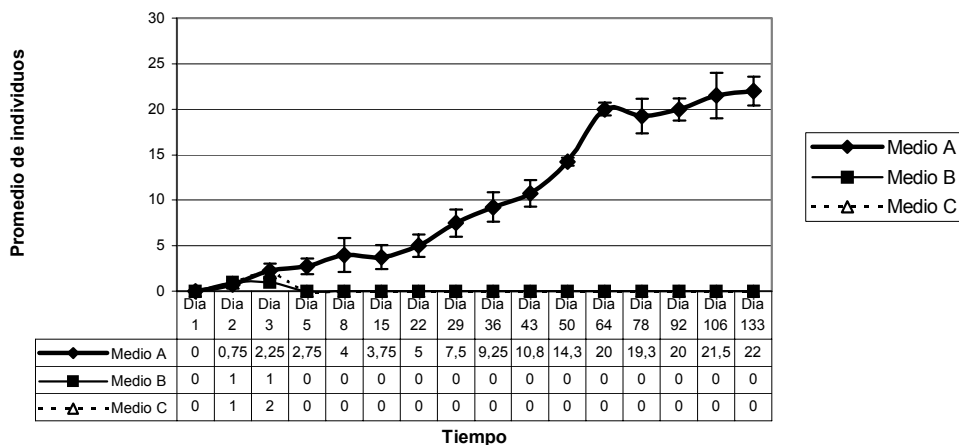


Figura 2.- Promedio de hembras grávidas en los cultivos de *Daphnia magna* en los 3 medios evaluados (número de replicas n=3). Las barras verticales representan la desviación estándar.

la metodología de cultivo de *Ceriodaphnia dubia* descrita por Lee et al. en 1997 la alimentación de dichas dafnias consiste en una suspensión YTCA (yeast, trout chow, alfalfa) que contiene levadura seca, alimento para peces y alfalfa seca y es complementada con algas unicelulares (*Scenedesmus subspicatus*). Además en Withman & Miller (1982) utilizan sólo levadura seca como alimento para *Daphnia magna*.

Cuando se evaluaron los medios con levadura fresca disuelta (medios B y C) se observó turbidez a las 48 horas, probablemente debido al crecimiento bacteriano ya que la concentración de levadura fresca es lo suficientemente alta para propiciar el desarrollo de microorganismos ambientales (Madigan et al., 2003), mientras que en los cultivos con alfalfa (medio A) no se observó turbidez hasta dos semanas después.

En la Figura 1 se puede observar además que las 4 cepas mantenidas en el medio A mostraban un desarrollo uniforme y similar. Asimismo tanto en el caso de la Figura 1 como de la Figura 2 se puede observar un incremento paulatino de la población hasta llegar a una estabilización del número de individuos de estas poblaciones, probablemente debido a que se llega a un equilibrio en la interacción de los factores bióticos y abióticos dentro del ecosistema formado.

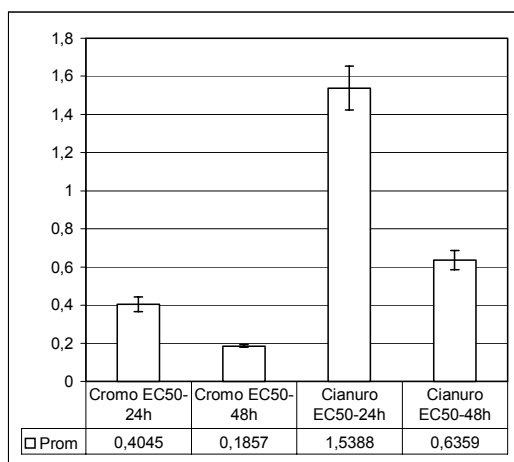


Figura 3. Valores de EC50 a las 24 y 48 horas frente a dicromato de potasio y cianuro de potasio

Tabla 2. Valores de EC50 frente a cianuro de potasio

Especies	Exposición horas	EC50 (mg/L)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> *	1	0,94 ± 0,17
	48	2,52 ± 0,2
<i>Daphnia magna</i>	24	1,54 ± 0,12
	48	0,64 ± 0,05

* De Lee et al., 1997

La norma ISO 6341 recomienda la evaluación de la sensibilidad de los individuos ante soluciones de referencia como 2,4,5-triclorofenoxiacetato y dicromato de potasio. En nuestro caso los valores de EC50-24h para dicromato de potasio se encontraron entre 0,3632 y 0,4243 mg/L (Figura 3). Esta alta sensibilidad nos indicaría que estas cepas de *Daphnia magna* serían útiles para evaluar muestras de efluentes con posible contaminación de cromo ya que los valores de EC50 se encuentran muy por debajo del LMP (límite máximo permisible) dado por el Ministerio de Salud de 1 mg/L.

Las cepas de *Daphnia magna* mostraron un EC50 a las 48 horas frente a cianuro de 0,6359 mg/L ± 0,05165. El Ministerio de Energía y Minas de Perú (RM N° 011-96-EM/VMM) determina que hasta 1 mg/L de cianuro total es permitido en los efluentes de la industria minera, por lo que las cepas estudiadas pueden ser utilizadas como bioindicadores en este rango.

Se ha comparado dos ensayos ecotoxicológicos agudos utilizando *Ceriodaphnia dubia* (Lee et al. 1997) frente a cianuro de potasio con los resultados encontrados en el presente trabajo (Tabla 2), se puede observar que la sensibilidad ante cianuro de potasio es mayor en las cepas de *D. magna* utilizadas. En general se conoce que *Ceriodaphnia dubia* es un bioindicador más sensible (Wong y Dixon 1995; Rinderhagen et al. 2000), por lo cual sería interesante evaluar la sensibilidad de las cepas aisladas frente a otras soluciones de contaminantes.

El sistema de cultivo a base de una alimentación con jugo de alfalfa resulta económica y efec-

tiva para el desarrollo de *D. magna*, además las cepas presentan una alta sensibilidad a contaminantes por lo que dicho sistema es un candidato ideal para los laboratorios de bajos recursos que requieran mantener un bioindicador efectivo para ensayos ecotoxicológicos agudos.

Agradecimientos

Al profesor Manuel Elías Gutiérrez (Colegio de la Frontera Sur, México) por la identificación de nuestras muestras de *Daphnia magna*. Al Dr. Paul Hebert (universidad de Guelph, Canadá) y al Dr. Stanley Dodson (Universidad de Wisconsin, USA) por el envío de artículos sobre bioensayos de cladóceros. Al Blgo. Jorge Carrillo Segura por su apoyo en la obtención de las muestras de *D. magna* y a la Blga. Johanna Sanchez Dávila por su apoyo en la redacción del presente artículo.

Literatura Citada

- Biesinger K., L. Williams & J. Van der Schalie. 1987. Procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays. EPA/600/8 - 87/011. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. 57 pp.
- Brooks J. 1957. The Systematics of north American *Daphnia*. Memoirs of the Connecticut Academy of Arts & Sciences 13:1-180
- Dodson S. & T. Hanazato. 1995. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. Environ. Health. Perspect. 103 (Suppl 4):7-11
- Ferrando M., E. Sancho & E. Andre-Moliner. 1999. Toxicity studies of tetradifon to *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Restoration 2(1):14-18
- Horning W. & C. Weber. 1985. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-85/014. Environmental monitoring and support laboratory, Cincinnati, OH. 162 pp.
- International Standard Organization. 1982. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea) Primera edición ISO 6341-1982 (E)
- Lee S., E. Na, Y. Cho, B. Koopman & G. Bitton. 1997. Short-term toxicity test based on algal uptake by *Ceriodaphnia dubia*. Water Environ Res 69(7):1207-1210
- Madigan M., J. Martinjo & J. Parker. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. 10ª Ed. Pearson. Prentice Hall., Madrid.
- Martinez-Tabche L., M. Romero Solis, E. Lopez & M. Galar. 1999. Efecto tóxico del DDT, clordano y agua de la presa Ignacio Ramirez (México) sobre *Daphnia magna* (Crustacea: Daphniidae). Revista de Biología Tropical 47(4):681-690
- Rinderhagen M., J. Ritterhoff & G. Zauke. 2000. Crustaceans as Bioindicators. Environmental Research Forum 9:161-197
- Sanchez M., M. Ferrando, E. Sancho & E. Andreu. 1999. Assessment of the toxicity of a pesticide with two-generation reproduction test using *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C:247-252
- Silva J., J. Iannacone, A. Cifuentes, L. Troncoso, E. Bay-Schmith & A. Larrain. 2001. Assessment of sensitivity to pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. Ecotoxicology and Environmental Restoration 4(1):10-17
- Sobral O., C. Chastinet, A. Nogueira, A. Soares, F. GonValves & R. Ribeiro. 2001. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*?. Ecotoxicology and Environmental Safety 50:174-179
- Withman, L. & R. Miller. 1982. The phototactic behavior of *Daphnia magna* as an bioindicator of chronic toxicity. Proc. Okla. Acad. Sci. 62:22-33
- Wong P. & D. Dixon. 1998. Standard methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report no. MFE80205. NIWA report for the Ministry for the Environment, Wellington, New Zealand.